

REC'D 18 FEB 2003

WIPO PCT



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

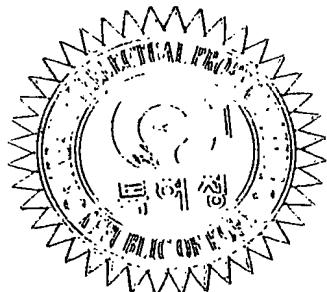
This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Intellectual  
Property Office.

BEST AVAILABLE COPY

출 원 번 호 : 10-2002-0004297  
Application Number

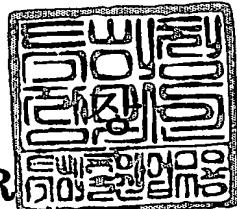
출 원 년 월 일 : 2002년 01월 24일  
JAN 24, 2002  
Date of Application

출 원 인 : 김범준  
KIM BUM JOON  
Applicant(s)



2003 01 21  
년 월 일

특 허 청  
COMMISSIONER



**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

## 【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.01.24
【발명의 명칭】	미코박테리움속 균종의 hsp65 유전자 증폭용 프라이머 및 이를 이용한 미코박테리움속 균종의 동정방법
【발명의 영문명칭】	PRIMERS FOR AMPLIFYING HSP 65 GENE OF MYCOBACTERIAL SPECIES AND METHOD OF IDENTIFICATION OF MYCOBACTERIAL SPECIES WITH THE SAME
【출원인】	
【성명】	김범준
【출원인코드】	4-2001-033138-7
【대리인】	
【명칭】	유미특허법인
【대리인코드】	9-2001-100003-6
【지정된변리사】	원영호
【포괄위임등록번호】	2001-048489-7
【발명자】	
【성명】	김범준
【출원인코드】	4-2001-033138-7
【발명자】	
【성명】	국윤호
【출원인코드】	4-1998-030545-3
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김정희
【성명의 영문표기】	KIM, JAUNG HEE
【주민등록번호】	780228-2094921
【우편번호】	604-757
【주소】	부산광역시 사하구 다대2동 삼환아파트 202동 1401호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	임성인
【성명의 영문표기】	IM, SEONG IN

【주민등록번호】	781015-2951011		
【우편번호】	690-122		
【주소】	제주도 제주시 아라2동 1468-2번지		
【국적】	KR		
【발명자】			
【성명의 국문표기】	변경희		
【성명의 영문표기】	BYUN, KYUNG HEE		
【주민등록번호】	760421-2932717		
【우편번호】	690-022		
【주소】	제주도 제주시 이도2동 고덕하이츠빌라 203호		
【국적】	KR		
【심사청구】	청구		
【핵산영기 및 아미노산 서열목록】			
【서열개수】	2		
【서열목록의 전자파일】	첨부		
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대 리인 유미특허법 인 (인)		
【수수료】			
【기본출원료】	20	면	29,000 원
【가산출원료】	13	면	13,000 원
【우선권주장료】	0	건	0 원
【심사청구료】	9	항	397,000 원
【합계】	439,000 원		
【감면사유】	개인 (70%감면)		
【감면후 수수료】	131,700 원		
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통		

**【요약서】****【요약】**

본 발명은 미코박테리움속 균종에 특이적인 프라이머쌍, 및 이를 이용한 미코박테리움속 균종의 동정방법에 관한 것으로서, 더욱 자세하게는 미코박테리움속 균종의 hsp65 유전자를 증폭하는 프라이머쌍, 이를 이용하여 미코박테리움속 균종의 hsp65 유전자를 PCR(Polymerase Chain Reation) 증폭하고, 증폭된 핵산내에 존재하는 특정 제한효소 부위를 이용한 RFLP 분석(Restriction Fragment Length Polymorphism Anaylsis)으로 미코박테리움속 균종을 동정하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 프라이머쌍 및 이를 이용한 PCR-RFLP 방법은 기존의 동정 방법보다도 간편하고 저렴하며 특이적인 미코박테리움 속 균종 탐지 및 동정 방법이며, 시료내에 포함된 미코박테리움속 균의 감염여부 및 균종의 동정을 신속하고 정확히 진단할 수 있는 진단 키트에 사용될 수 있다.

**【대표도】**

도 5

**【색인어】**

미코박테리움속 균종, 결핵균군, 비결핵항산성균군, 프라이머, PCR증폭, RFLP, hsp 65

## 【명세서】

## 【발명의 명칭】

미코박테리움속 균종의 hsp65 유전자 증폭용 프라이머 및 이를 이용한 미코박테리움속 균종의 동정방법{PRIMERS FOR AMPLIFYING HSP 65 GENE OF MYCOBACTERIAL SPECIFES AND METHOD OF IDENTIFICATION OF MYCOBACTERIAL SPECIFES WITH THE SAME}

## 【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명에 따른 hsp65 유전자 분절 및 프라이머의 위치를 나타내는 모식도이다.

도 2는 미코박테리움속 균종의 DNA 증폭산물을 분석 사진으로서, 패널A는 표준균종의 hsp65 유전자의 증폭산물을 분석한 결과를 나타내고, 패널 B는 임상 분리 균종의 hsp65 유전자의 증폭산물을 분석한 결과를 나타낸다.

도 3은 미코박테리움속 균종의 hsp65 유전자의 증폭산물을 XhoI로 처리한 후 아가로스 젤 전기영동을 수행한 결과를 나타내는 사진이다.

도 4는 임상에서 분리된 미코박테리움속 균종의 hsp65 유전자 분절의 증폭산물을 XhoI로 처리한 후 아가로스 젤 전기영동을 수행한 결과를 나타내는 사진이다.

도 5는 27종 미코박테리움속 균종의 hsp65에 특이적인 프라이머쌍과 제한효소를 사용하여 PCR-RFLP 분석으로 얻어진 미코박테리움속 균종의 동정결과를 나타내는 요약도이다.

**【발명의 상세한 설명】****【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

<6> 본 발명은 미코박테리움속 균종에 특이적인 프라이머쌍, 더욱 자세하게는 미코박테리움속 균종의 hsp65 유전자를 증폭하는 프라이머쌍, 및 이를 이용한 미코박테리움속 균종의 동정방법에 관한 것이다.

<7> 미코박테리움(*Mycobacterium*)속(屬)에는 결핵, 우형결핵(牛形結核), 나병(癩病)과 같이 사람과 동물에 심각한 질병을 일으키는 균종(species)뿐 아니라, 기회감염균으로 일컬어지는 균종, 그리고 자연환경에서 볼 수 있는 사물(死物)기생 균종(saprophytic species) 등 현재까지 약 72종(species)이 알려져 있으며, 그 중 인체질환과 관련된 것 이 25여종에 이르는 것으로 알려져 있다(Shinnick, T. M., and Good, R.C., *Mycobacterial taxonomy*, Eur. J. Microbiol Infect. Dis., 13(11):884-901(1994); Murray, P.R., E. J., Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Yolken., *Manual of Clinical Microbiology*, 6th Ed. ASM Press, Washington, D. C. 400-437(1995)). 미코박테리아 감염증 가운데 가장 많은 질병은 결핵(*Tuberculosis*)으로, 강한 병원성을 갖는 결핵균군(群)(*M. tuberculosis* complex: TB complex)으로 구분되는 *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*의 4종이 원인균이며, 이 중 결핵균(*M. tuberculosis*)이 가장 흔하고 중요한 원인균으로 알려져 있다.

<8> 결핵은 항 결핵제의 효율적인 사용으로 1980년대 말까지는 계속 감소하는 추세였으나, 1990년대에 내성결핵균의 증가와 후천성면역결핍증 환자의 증가 등으로 선진국에서

는 점차 증가세에 있다(Bloom BR, "Back to a frightening future," *Nature* 358: 538-539, 1992; Bloom BR, Murray CJL "Tuberculosis commentaty on a reemergent killer," *Science*, 257: 1055-1064, 1992). 특히 국내는 IMF 구제금융시기에 노숙자의 증가 등으로 현재 결핵으로 인한 사망이 감염질환 중에서 가장 높고 연 3000명 이상이 결핵으로 인해 사망한다고 보고되고 있다.

<9> 비결핵항산성균(Mycobacteria Other than *Mycobacterium tuberculosis*, MOTT 또는 *nontuberculous mycobacteria*, NTM)은 임상적으로 대부분 면역저하 환자나 노약자에서 질병을 일으키고 임상소견은 결핵과 유사하다. 비록 국내에는 상대적으로 결핵에 비해 발생율이 현저하게 낮지만 생활환경에 널리 분포하고 있어서, 임상검체로부터 분리되어도 병원성 여부를 판단하기 힘들어 진단이 쉽지 않고, 또한 대부분의 항 결핵제에 약제 내성을 보여 치료가 어려우며, 재발율도 높은 것으로 알려져 있다. 또한 이러한 비결핵항산성균은 면역 기능의 저하가 없는 환자에게도 질병을 일으키는 사실이 보고되었다. 지난 10년간 미국에서 발생한 미코박테리아증의 발생 빈도를 보면 결핵이 전체의 50% 정도를 차지하고 비결핵항산성균증이 나머지 50%를 차지하고 있다(Good RC. From the Center for Disease Control. Isolation of *nontuberculous mycobacteria* in the United States, 1979. *J Infect Dis.* 1980;142:779-83.). 1980년 이후에 HIV(Human immunodeficiency virus) 감염이 확산되면서, 비결핵항산성균이 면역저하 환자에서 전신적인 파종성 감염을 일으킨다는 것이 알려져 비결핵항산성균에 대한 관심이 높아지고 있다(Barnes PF, Bloch AB, Davison PT, Sneider DE Jr: *Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection*. *N Engl J Med* 324: 1644-1649, 1991).

<10> 국내에서도 결핵 유병율이 점차 감소하고 있고, 후천성 면역결핍증 환자 및 면역억제제의 사용이 점차 증가하는 추세에 있기 때문에 상대적으로 비결핵항산성균증에 의한 감염의 빈도가 더욱 높아질 가능성이 있다. 대한결핵 및 호흡기학회에서 1995년에 조사한 비결핵항산성균증 전국실태조사에 따르면 1990년 이후에 확인된 비결핵항산성균이 전체 연도에서 발생된 비결핵항산성균증의 84.2%를 차지할 정도로 최근에 현저한 증가를 보이고 있다.

<11> 미코박테리움속균종은 각 종에 따라 항결핵제 내성 패턴이 서로 다르기 때문에, 약제 및 치료 방법이 서로 다른 경우가 많다(Wolinsky E: *Mycobacterial diseases other than tuberculosis. Clin Infect Dis* 15: 1-10, 1992). 따라서, 미코박테리움 속 균종을 종수준별로 감별 및 동정하는 것이 필요하다.

<12> 미코박테리움속 균종을 동정 또는 감별하기 위한 방법중 하나인 생화학적 동정 방법은 미코박테리움속 균종의 발육 속도가 느리기 때문에 시간이 오래 걸리고 숙련된 사람이 필요하다는 단점이 있다. 고성능액체크로마토그래피( High-performance lipid chromatography(HPLC)) 및 박층액체크로마토그래피(Thin layer lipid chromatography(TLC))를 이용한 세포벽의 지질 분석에 의한 동정방법은 역시 수행하기 까다롭고 비용이 많이 드는 단점이 있어 소수의 실험실에서만 이용하고 있다. 기존의 미코박테리움속 균종 동정 방법은 이들 균의 발육속도가 느리다는 생물학적인 특성 때문에 진단 및 동정하는 데에 있어서 시간이 많이 소요되므로(완속발육균의 경우 약 2-3개월 소요), 결국 임상적으로 치료시기를 놓칠 수 있는 문제점이 있다(Nolte FS, Metchock B: *Mycobacterium*, In Murray PR, Baron EJ, Pfaffer MA, Tenover FC, Yolken RH (ed.),

Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 400-437, 1995.).

<13> 상기 문제점을 극복하고자, 1990년 이래로 여러 유전자를 표적으로 하여 분자생물학적인 방법으로 미코박테리움속 균종을 탐지 및 동정하는 방법이 널리 이용되고 있으며, 그 중 가장 대표적인 것이 16S rDNA를 표적으로 하여 염기서열 분석에 의해 균동정을 하는 방법이 가장 널리 이용되었다. 그러나, 이 방법은 표적 유전자를 증폭한 후 정제하여 염기서열 분석장치를 이용하여 염기서열을 분석하여야 하므로 비용과 시간이 많이 소요된다는 단점이 있다(Rogall, T, Flohr T, Bottger EC: Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. *J Gen Microbiol* 136: 1915-1920, 1990; Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Bottger EC, "Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria," molecular versus phenotypic methods.

*J Clin Microbiol* 34: 296-303, 1996. 3; El Amin NM, Hanson HS, Pettersson B, Petrini B, Stedingk LV: Identification of non-tuberculous mycobacteria "16S rRNA gene sequence analysis vs. conventional methods," *Scand J Infect Dis* 32: 47-50, 2000.) 그 외에 상품화된 ACCUProbe™ (GenProbe, San Diego, USA)과 같이 미코박테리움속 균종의 염기서열 특이성을 이용한 혼성화법(hybridization)으로 미코박테리움속 균종을 동정하는 방법이 있으나, 이 방법 역시 비용이 많이 들고 위양성(false positive)의 문제점 등 여러 단점이 보고되고 있다(Devallois A, Picardeau M, Paramasivan CN, Vincent V, Rastogi N " Molecular characterization of *Mycobacterium avium* complex isolates giving discordant results in AccuProbe tests by PCR-restriction enzyme analysis, 16s rRNA sequencing, and DT1-DT6 PCR. *J Clin Microbiol* 35: 2767-2772, 1997).

<14> 미코박테리움속 균종을 분자생물학적인 방법을 이용하여 탐지 및 동정함에 있어 기술상으로 가장 간편하고 저렴한 방법은 모든 세균들 사이에 공통적으로 존재하는 시계분자(chronometer molecule)를 표적으로 하여 이 시계분자들을 PCR로 증폭하고, 이를 증폭산물의 유전자내에 존재하는 특이적인 염기서열을 인지하는 제한효소를 처리하여 이들 절편의 다양성에 의해 균종을 감별하는 PRA (PCR-Restriction analysis) 방법이다. 현재, 이러한 미코박테리움속 균종 동정용 PRA 방법으로는

*rpoB*, 그리고 *hsp65* 유전자 등 여러 시계 분자를 표적으로 하는 방법들이 개발되었다 (Kim BJ, Lee KH, Park BN, Kim SJ, Bai GH, Kim SJ, Kook YH, "Differentiation of mycobacterial species by PCR-restriction analysis of DNA (342 base pairs) of the RNA polymerase gene (*rpoB*)," *J. Clin. Microbiol.* 39: pp2102-2109, 2001; Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. "Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis," *J. Clin. Microbiol.* 31(2):175-8. 1993). Telenti 등의 상기 문헌에 의하면, *hsp65*를 PCR방법으로 증폭하고 제한효소 *BstE* II와 *Hae* III으로 절단하고 아가로스 젤 전기영동으로 절단 패턴을 분석하여 29종의 균종과 서브종의 미코박테리움속 균종을 구별동정하는 방법을 개시하고 있다.

<15> 그러나, 이러한 방법들은 미코박테리움속 균종을 감별하는 데에 여러 제한효소를 사용해야 하므로 처리비용이 높고 *Hae* III의 경우에는 절단 단편의 크기가 작아 10bp 단편까지도 감별해야 하고, 정확한 감별을 위해서는 기존 각 균종의 절편 양상에 대한 데 이터베이스를 이용해 감별해야 하거나, 혹은 의심되는 균종의 표준균주의 DNA를 같이 절단한 후 같이 전기영동해서 비교해야 하는 문제점이 있다.

#### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<16> 상기와 같은 문제점을 해결하고자, 본 발명의 목적은 미코박테리움속 균종의 *hsp65* 유전자를 증폭하기 위한 프라이머쌍을 제공하는데 있다.

<17> 본 발명의 또다른 목적은 간단하고 정확하고 저렴한 미코박테리움속 균종을 동정하는 방법을 제공하고자 한다.

<18> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 hsp65 증폭용 프라이머쌍 및 Xho I을 유효성분으로 포함하는 미코박테리움속 균종의 감염 및 진단을 위한 진단 키트를 제공하고자 한다.

#### 【발명의 구성 및 작용】

<19> 본 발명은 미코박테리움속 균종의 hsp 65 증폭용 프라이머, 바람직하게는 SEQ ID NO: 1 및 SEQ ID NO: 2에 나타난 염기서열을 가지며, 미코박테리움(*Mycobacterium*)속 균종의 hsp 65(Heat Shock Protein 65) 유전자 분절을 특이적으로 증폭시키는 프라이머쌍에 관한 것이다.

<20> 또한, 본 발명은 미코박테리움속 균종의 hsp 65 증폭용 프라이머, 바람직하게는 SEQ ID NO: 1 및 SEQ ID NO: 2에 나타난 염기서열을 갖는 프라이머쌍을 이용하여 미코박테리움속 균종의 hsp 65 분절을 증폭하고, 상기 증폭된 분절내에 존재하는 특정 제한효소 인식부위를 이용한 RFLP 분석(Restriction Fragment Length Polymorphism)으로 미코박테리움속 균종을 동정하는 방법을 제공하고자 한다.

<21> 또한, 본 발명은 미코박테리움속 균종의 hsp 65 증폭용 프라이머, 바람직하게는 SEQ ID NO: 1 및 SEQ ID NO: 2에 나타난 염기서열을 갖는 프라이머쌍 및 Xho I 제한효소를 포함하며, 상기 프라이머쌍을 이용하여 시료에 포함된 미코박테리움속 균종의 hsp65 유전자 분절을 얻고 RFLP를 수행하여 얻어진 분절의 크기로서 결핵균과 비결핵 항산성균을 감별 및 진단하기 위한 진단키트에 관한 것이다.

<22> 본 발명은 표적 유전자로서 모든 세균에 존재하는 시계분자 (chronometer molecule)인 hsp 65(Heat Shock Protein 65)를 코딩하는 hsp65 유전자를 이용하여 결핵균뿐만 아니라 비결핵항산성균을 동시에 증폭시켜 탐지할 수 있는 PCR용 프라이머를 제

공하고, 증폭된 *hsp65* 유전자 분절을 제한효소인 *Xba*-I으로 절단하면 결핵균과 비결핵항산성균을 서로 감별할 수 있을 뿐만 아니라 비결핵항산성균도 서로 다른 절편을 형성함으로써 서로 다른 세 그룹으로 구분할 수 있다는 사실에 근거하여 본 발명을 완성하게 되었다.

<23> 이하에서 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

<24> 본 발명에서 미코박테리움속 균종의 동정을 위한 시계분자로서 결핵균의 1623-bp 전체 유전자 중에서 163번째 염기서열부터 806bp번째의 염기서열 총 644-bp의 염기서열을 사용하였으며, 이는 기존에 *Telenti* 등이 이용한 439bp의 유전자 분절과는 다른 부위의 분절이다(도 1).

<25> 본 발명에서 미코박테리움속 균종의 *hsp65* 유전자를 증폭하기 위한 바람직한 프라이머쌍을 얻기 위해서, 본 발명자들은 미코박테리움 속 균종중에서 전체 1623 bp의 *hsp65* 유전자의 염기서열이 분석된 *M. tuberculosis* (GenBank No. M15467) 및 *M. avium* (GenBank No. AF281650) 2주와 이들과 계통학적으로 가장 유사한 *Tsukamurella* 속 균종인 *T. paurometabola* (GenBank No. AF352578) 1주을 포함하여 총 3주의 염기서열을 분석하여 모든 미코박테리움 속 균종을 증폭시킬 수 있는 프라이머쌍을 제조한다. 각각 결핵균의 *hsp65* 염기서열 중에서 163번째부터 182번째까지의 총 20개의 염기로 구성된 정방향 프라이머와 787번째 염기서열부터 806 번째 염기로 구성되는 총 20개의 염기로 구성된 역방향 프라이머를 사용할 수 있다. 또한, 미코박테리움속 균종의 *hsp65* 유전자의 664bp 유전자 분절을 증폭하기 위해서 상기 프라이머쌍을 다소 변경하거나 상기 프라이머 서열을 포함하는 서열을 프라이머 서열도 또한 본 발명에 사용할 수 있음은 본 발명이 속하는 분야의 통상의 지식을 가진 기술자에게 자명할 것이다. 상기 프라이머쌍 부

위는 미코박테리움 속 균종에 속하는 *M. tuberculosis*와 *M. avium*와 100% 염기서열 상동성을 보일 뿐만 아니라 다른 속 균종인 *Tsukamurella paurometabola* 와도 100% 상동성을 보이는 계통학적으로 보존된 부위를 사용하였다. 바람직하게는, 정방향 프라이머 서열은 5' -ATCGCCAAGGAGATCGAGCT-3' 이고 이를 SEQ ID NO: 1에 나타냈으며 HSPF3로 명명하였다. 또한, 역방향 프라이머 서열은 5' -AAGGTGCCGCCGGATCTTGT-3' 이고 이를 SEQ ID NO: 2에 나타냈으며 HSPR4로 명명하였다. 본 발명에 사용된 시계분자인 hsp 65 분절과 프라이머위치를 도 1에 개략적으로 표시하고 있다.

<26> 본 발명은 미코박테리움속 균종의 hsp 65 증폭용 프라이머, 바람직하게는 SEQ ID NO: 1 및 SEQ ID NO:2에 나타난 염기서열을 갖는 프라이머쌍을 이용하여 미코박테리움속 균종의 hsp 65 분절을 증폭하고, 상기 증폭된 분절내에 존재하는 특정 제한효소 인식부위를 이용한 RFLP 분석(Restriction Fragment Length Polymorphism)으로 미코박테리움속 균종을 동정하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 미코박테리움속 균종의 동정방법은 간편하고 저렴하고 특이적인 미코박테리움속 균종을 동정하는 방법이다.

<27> 본 발명에서는 hsp65 유전자를 표적으로 하여 기존의 방법보다 훨씬 간편하고 비용 면에서 유리한 새로운 PRA 방법으로서, 종래에 hsp65

유전자를 이용한 PRA 방법이 존재하나 이 방법은 hsp65 유전자의 439bp의 분절을 표적으로 하며 또한 균종 감별을 위하여 두 개의 제한효소 즉 Hae III 및 BstE II를 이용한 시스템이다(Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol. 31(2):175-8. 1993). 본 발명에서는 모든 미코박테리움 속 균종의 644 bp hsp65 유전자 분절을 증폭시킬 수 있는 새로운 프라이머쌍을 제조한 후 이를 이용하여 PCR로 증폭 후 단 하나의 제한효소인 Xho-I을 이용하여 미코박테리움 속 균종을 감별하는 새로운 시스템이다. 또한 본 발명에서 미코박테리움 속 균종의 감별진단을 위하여 사용한 제한효소 Xho-I을 이용하여 상기에서 상술한 프라이머에 의해 증폭된 PCR 산물 644bp의 처리, 즉 PRA 방법은 미코박테리움 속 균종에서 임상적으로 가장 중요한 결핵균군을 3개의 독특한 유전자 분절 (391bp, 150bp, 103bp)을 생산함으로서 다른 비결핵항산성균과의 감별을 가능하게 한다. 이 방법은 역시 지금까지 보고되지 않은 새로운 방법으로서 앞으로 임상실험실에서 효과적이고 쉽게 결핵균을 감별하는 데에 이용될 수 있다.

<28> 본 발명에 따른 PRA는 한번의 처리로 결핵균군을 감별할 수 있을 뿐만 아니라 비결핵항산성균도 서로 다른 3 가지 그룹으로 그룹화가 가능하다. 즉, 신속발육균은 644-bp의 한 분절만을 생산함으로써 다른 완속발육균과 감별이 가능할 뿐만 아니라 완속발육균도 임상적으로 가장 많이 분리되는 비결핵항산성균인 *M. avium* 콤플렉스(*M. avium*과 *M. intracellulare*) 등은 391bp, 169bp, 및 84bp의 산물을 생산함으로써 두 개의 유전자 산물을 (391bp, 253bp)을 생산하는

*M. kansasi* 등의 그룹과 감별이 가능하다. 미코박테리움 속 균종은 70여개 이상의 균종들로 구성되어 있지만 실제로는 *M. tuberculosis*, *M. avium* complex, 등 약 10 주 미만의 균종들이 임상분리 검체의 99%를 차지하기 때문에 본 PRA 방법은 이들 균종의 감별에 효과적으로 응용될 수 있다.

<29> 일반적인 PRA 방법은, 1) DNA 추출 및 분리(DNA extraction), 2) PCR 증폭(PCR amplification), 3) 증폭된 산물을 확인, 4) 제한효소 처리(Restriction digestion), 5) 제한효소 절단 단편분석(Restriction analysis) 및 젤 이미지 분석(Visualization by image capture systems) 단계를 포함한다.

<30> 미코박테리움 속 균종의 hsp65 유전자의 644bp 분절내 특이적으로 존재하는 제한효소 인식자리를 인식가능한 제한효소는 모두 사용가능하며, 바람직하게는 *Xho* I이다. 본 발명의 일례에서, hsp65 유전자 전체염기서열 (1623-bp)이 분석된 2균주의 미코박테리움 속 균종의 염기서열을 (*M. tuberculosis*, *M. avium*) Genbank 데이터베이스에서 선택한 후 본 발명에서 이용되는 644 bp의 염기서열 (163번째 염기서열부터 806번째 염기서열 까지)을 선택하여 Dnastar 소프트웨어의 Mapdraw 프로그램을 이용하여 이 두 종을 감별 할 수 있는 6개의 특정염기서열을 인지하는 제한효소인 *Xho*-I(5'-CTCGAG-3')을 찾을 수 있다.

<31> 또한, 제한효소 절단 단편분석을 위해서는 단편의 크기를 구별할 수 있는 분석방법 을 모두 본 발명에 적용가능하나, 바람직하게는 전기영동법이고, 더욱 바람직하게는 아가로스 젤 전기영동 또는 폴리아크릴아미드 젤 전기영동이다.

<32> 본 발명에 따른 미코박테리움속 균종의 동정방법에 있어서 증폭된 hsp 65 분절을 제한효소 Xho I로 처리한 후 RFLP분석에 의해 결핵균군과 비결핵항산성균군을 구별하여 동정할 수 있다. 또한, 상기 결핵균군은 제한효소로 절단된 hsp 65 분절의 단편크기가 391 bp, 150 bp, 및 103 bp를 가지는 것에 의해 구별될 수 있다.

<33> 또한, 본 발명의 일례에서, 증폭된 hsp 65 분절이 Xho I으로 절단여부에 따라 상기 제한효소에 의한 절단되지 않고 644bp 분절을 갖는 것은 신속발육균이므로, 비결핵항산성균중 신속발육균을 구별하여 동정하는 방법을 제공한다. 또한, 증폭된 hsp65 분절을 Xho I로 처리한 후 RFLP분석에 의해 얻어진 단편의 크기가 391bp, 169bp, 및 84bp인 것을 분석기준으로 하여 미코박테리움 아비움(*M. avium*), 미코박테리움 인트라셀룰라레(*M. intracellularare*), 미코박테리움 셀라툼(*M. celatum*), 미코박테리움 쉬모이데(*M. shimoidei*), 및 미코박테리움 줄가이(*M. szulgai*)로 이루어진 군에서 선택된 미코박테리움속 균군을 동정할 수 있다.

<34> 본 발명의 일례에서, 상기 증폭된 hsp65 분절을 Xho I로 처리한 후 RFLP분석에 의해 얻어진 단편의 크기가 391bp, 및 253bp인 것을 분석기준으로 하여 미코박테리움 가스트리(*M. gastri*), 미코박테리움 제나벤세(*M. genavense*), 미코박테리움 고르도내(*M. gordonaee*), 미코박테리움 해모필럼(*M. haemophilum*), 미코박테리움 칸사시(*M. kansasii*), 미코박테리움 말모엔세(*M. malmoense*), 미코박테리움 마리넘(*M. marinum*), 미코박테리움 스크로풀라세움(*M. scrofulaceum*), 미코박테리움 시미애(*M. simiae*), 및 미코박테리움 울세란스(*M. ulcerans*)로 이루어진 군에서 선택된 미코박테리움속 균군을 동정할 수 있다.

<35> 본 발명에 의해서 얻어진 미코박테리움속 균종의 제한효소 단편의 크기에 따른 동정 결과를 도 5에 요약하여 나타내고 있다.

<36> 본 발명은 또한 본 발명은 미코박테리움속 균종의 hsp 65 증폭용 프라이머, 바람직하게는 SEQ ID NO: 1 및 SEQ ID NO: 2에 나타난 염기서열을 갖는 프라이머쌍 및 Xho I 제한효소를 포함하며, 상기 프라이머쌍을 이용하여 시료에 포함된 미코박테리움속 균종의 hsp65 유전자 분절을 얻고 RFLP를 수행하여 얻어진 분절의 크기로서 결핵균과 비결핵항산성균을 감별 및 진단하기 위한 진단키트에 관한 것이다. 상기 진단키트는 또한 PCR 증폭용 키트 및 RFLP용 키트를 추가로 포함할 수 있다. 상기 PCR 증폭용 키트 및 RFLP 키트는 본 발명이 속하는 기술분야에서 알려진 것을 사용가능하며, 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용할 수도 있다.

<37> 이상에 기재된 바와 같이, 본 발명에서 사용하는 Xho-I 제한효소는 가격면에서 기존의 PRA방법에 사용되는 제한효소에 비해 두 배이상 저렴하고, 한가지 제한효소만 사용하므로 비용과 시간 면에서 유리하다는 장점이 있다. 또한 종래 PRA 방법은 표적이 439-BP로 본 발명의 644-BP에 비해 짧고 또한 2 개의 효소중 4개의 염기를 인지하는 hae-III를 사용하므로 많은 절편을 생산함에 따라 균종 감별에 있어 심지어는 10-bp 이하의 차이도 감별하여야 한다. 따라서, 기존 방법은 정확한 감별을 위해서는 기존 각 균종의 절편 양상에 대한 데이터베이스를 이용해 감별해야 하거나, 혹은 의심되는 균종의 표준균주의 D NA를 같이 절단한 후 같이 전기영동해서 비교해야 함. 따라서, 충분히 길고 6 개의 염기를 인지하는 Xho-I 제한효소를 사용하는 본 시스템이 단지 아가로스 젤 전기영동상에서 균종을 감별할 수 있는 데 비해 상대적으로 복잡한 과정을 필요로 하나,

본 발명의 분석방법은 단편크기를 분석함으로써 미코박테리움속 균종을 간단하고 정확하게 동정할 수 있다는 장점이 있다.

<38> 하기 실시예를 들어 본 발명을 더욱 자세히 설명할 것이나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일뿐 본 발명의 보호범위가 하기 실시예로 한정되는 의도는 아니다.

<39> [실시예]

<40> 실시예 1: 표준균종과 임상분리균종로부터 DNA 분리

<41> American Type Culture Collection(ATCC)에서 27주의 미코박테리움 속 표준균종을 분양받았다(표 1). 또한 결핵연구원에서 생화학적인 방법으로 균 동정이 완료된 198 주의 미코박테리아 임상분리균종을 얻었다(표 2). 이들 표준균종과 임상균종으로부터 비드 비터 폐놀(Bead beater phenol(BB/P)) 방법을 이용하여 DNA를 추출하였다. 균종의 집락을 따내, TEN 완충액(Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM: pH 8.0)에 부유시킨 후에 직경 0.1 mm 초자구 (diameter 0.1 mm; Biospec Products, Bartlesville, Okla., U.S.A.) 100  $\mu$ l (packing volume)와 폐놀: 클로로포름: 이소프로필알콜을 50:49:1로 혼합한 혼합용액 100  $\mu$ l를 함께 부유시켜 미니 비터(mini beater)로 1 분간 진탕하여 균체를 파쇄하였다. 얻어진 균 파쇄액을 12000 rpm으로 5 분간 원심분리한 후에, 상동액 (100  $\mu$ l)을 새로운 튜브에 옮긴 후, 60  $\mu$ l의 이소프로필알콜을 섞고, 다시 15000 rpm으로 15 분간 원심분리하였다. 침전물은 70% 에탄올로 세척한 후 TE 완충액(pH 8.0, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) 60  $\mu$ l로 DNA를 회수하였다. 이렇게 추출한 DNA를 미코박테리움 감별진단을 위한 PRA에 사용하였다.

&lt;42&gt; 【표 1】

미코박테리움속 표준균종		
결핵균군 (M. tuberculosis complex)		
번호	종명	균종
1	<i>M. africanum</i>	ATCC 25420
2	<i>M. bovis</i>	ATCC 19210
3	<i>M. bovis BCG</i>	French strain
4	<i>M. tuberculosis H37Rv</i>	ATCC 27294
완속발육균 (Slow growing mycobacteria)		
5	<i>M. avium</i>	ATCC 25291
6	<i>M. celatum Type I</i>	ATCC 51131
7	<i>M. celatum Type II</i>	ATCC 51130
8	<i>M. gastri</i>	ATCC 15754
9	<i>M. genavense</i>	ATCC 51233
10	<i>M. gordoneae</i>	ATCC 14470
11	<i>M. haemophilum</i>	ATCC 29548
12	<i>M. interjectum</i>	ATCC 51457
13	<i>M. intracellulare</i>	ATCC 13950
14	<i>M. kansasii Type I</i>	ATCC 12478
15	<i>M. malmoense</i>	ATCC 29571
16	<i>M. marinum</i>	ATCC 927
17	<i>M. scrofulaceum</i>	ATCC 19981
18	<i>M. shimoidei</i>	ATCC 27962
19	<i>M. simiae</i>	ATCC 25275
20	<i>M. szulgai</i>	ATCC 35799
21	<i>M. ulcerans</i>	ATCC 19423
신속발육균 (Rapid growing mycobacteria)		
22	<i>M. abscessus</i>	CAP97E-03
23	<i>M. chelonae</i>	ATCC 35749
24	<i>M. chitae</i>	ATCC 19627
25	<i>M. fortuitum</i> 49403	ATCC 49403
26	<i>M. fortuitum</i> 6841	ATCC 6841
27	<i>M. peregrinum</i>	ATCC 14467

&lt;43&gt; 【표 2】

임상 분리 균종	종명	분리군 번호(No. of isolates)
결핵균군 ( <i>M. tuberculosis</i> complex)		
	<i>M. tuberculosis</i>	54주
<i>M. bovis</i>		9주
완속발육균 (Slow growing mycobacteria)		
	<i>M. avium</i> complex	49주
<i>M. kansasi</i>		30주
<i>M. szulgai</i>		12주
<i>M. gordonae</i>		9주
<i>M. marinum</i>		3주
신속발육균 (Rapid growing mycobacteria)		
	<i>M. fortuitum</i>	17주
	<i>M. chelonae</i>	15주
합계		198주

<44> 실시예 2: *hsp65* 유전자 증폭을 위한 프라이머 제조

<45> 모든 미코박테리움 속 균종의 *hsp65* 유전자 분절을 증폭시킬 수 있는 특이적인 정방향 프라이머(HSPF3)와 역방향 프라이머(HSPR4)를 제조하여 사용하였다. 미코박테리움 속 균종 중에서 다른 목적으로 전체 1623-bp *hsp65* 유전자의 염기서열이 분석된 *M. tuberculosis* (GenBank No. M15467), *M. avium* (GenBank No. AF281650) 2주의 염기서열과 계통학적으로 가장 유사한 츄가무렐라(*Tsukamurella*) 속 균종인 츄가무렐라 파우라로메탈블라(*T. paurometabola*)(GenBank No. AF352578) 1 주의 총 3주의 염기서열을 분석하여 모든 미코박테리움 속 균종을 증폭시킬 수 있는 프라이머쌍을 제조하였다(도 1). SEQ ID NO: 1 및 2에서 본 발명의 바람직한 프라이머를 나타냈고, 도 1에 위치를 도시하였다.

&lt;46&gt; 역방향 프라이머: HSPF3

&lt;47&gt; 5' -ATCGCCAAGGAGATCGAGCT-3'

&lt;48&gt; 역방향 프라이머: HSPR4

<49> 5' -AAGGTGCCGCGGATCTTGT-3'

<50> 실시 예 3: hsp 65의 644 bp유전자 분절의 증폭

<51> PCR 반응은 2U의 Taq 폴리머라제, 10 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>을 포함하는 AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Korea)를 이용한다. 실시 예 1에서 추출한 주형 DNA 50 ng, 프라이머 HSPF3 및 HSPR4를 각각 20 pmol씩 넣고, 증류수를 최종 부피가 20 μl가 되도록 첨가하여 혼합물을 만든다. PCR은 첫 번째 변성은 95°C로 5 분, 30 주기로 변성하고, 95°C 1분 아닐링, 62°C 45초 연장, 72°C 1분 30초, 최종 연장은 72°C 5분으로 수행하였다(Model 9600 thermocycler, Perkin-Elmer cetus).

<52> 증합효소 연쇄반응 후, 1% 아가로스 젤에 전기영동하여 644 bp의 반응산물을 확인하였으며, 그 결과를 도 2에 나타냈다.

<53> 제 2도에서 나타낸 바와 같이, 본 실험에서 사용한 27주의 표준균종과 198 주의 임상분리 균종 등 본 발명에서 사용한 모든 미코박테리아 균종에서 644 bp의 유전자 분절을 생산함을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명에서 제조한 프라이머 쌍을 이용한 PCR은 모든 미코박테리움 속 균종을 증폭시킬 수 있는 시스템이라고 할 수 있다. 도 2에서 패널A는 표준균종의 DNA 증폭산물을 나타낸 것으로서 구체적으로 다음과 같다.

<54> 레인M: 174를 *Hae*III 제한효소로 절단한 DNA 크기마커,

<55> 1: *M. tuberculosis*, 2: *M. bovis*,

<56> 3: *M. africanum*, 4: *M. avium*,

<57> 5: *M. intracellulare*, 5: *M. scrofulaceum*,

<58> 6: *M. gordonaiae*, 7: *M. szulgai*,

<59> 8. *M. marinum*, 9: *M. ulcerans*,

<60> 10: *M. celatum* Type I, 11. *M. genavense*,

<61> 12. *M. malmoense*, 13. *M. fortuitum* 6841,

<62> 14: *M. abscessus*, 15: *M. chelonae*,

<63> 16: *M. peregrinum*.

<64> 도 2에서 패널B는 국내 임상분리 균종의 DNA 증폭산물을 나타낸 것으로서 구체적으로 다음과 같다:

<65> 레인 M: 174을 *Hae*III 제한효소로 절단한 DNA 크기마커,

<66> 레인 1-4: Tbc - *M. tuberculosis* 임상분리 균종,

<67> 레인 5-7: Mac - *M. avium* complex의 임상분리 균종,

<68> 레인 8-10: Kac - *M. kansasii*의 임상분리 균종,

<69> 레인 11-13: Foc - *M. fortuitum*의 임상분리 균종,

<70> 레인 14-16: Chc - *M. chelonae* 의 임상분리 균종이다.

<71> 실시예 4: 미코박테리움속 표준 균종의 동정

<72> *hsp65* 유전자 전체염기서열 (1623-bp)이 분석된 2주의 미코박테리움 속 균종인 *M. tuberculosis* (GenBank No. M15467) 및 *M. avium* (GenBank No. AF281650)을 선택한 후, 본 발명에서 이용되는 644 bp의 염기서열(163번째 염기서열부터 806번째 염기서열까지)을 선택하여 Dnastar 소프트웨어의 Mapdraw 프로그램을 이용하여 이 두 종을 감별할 수 있는 6개의 특정염기서열을 인지하는 제한효소인 *Xba*-I (5'-CTCGAG-3')을 찾았다.

<73> 실시예 2에 의해 증폭된 미코박테리움 속 표준 균종 27주의 644-bp PCR 반응 산물 중 10  $\mu$ l를 새로운 튜브에 옮긴 후, 제한효소인  $Xho$ -I 을 1 $\mu$ l(10 단위)와 10X 완충액 2  $\mu$ l 및 멸균 증류수 7  $\mu$ l를 첨가하여 총 20  $\mu$ l의 혼합물을 제조한 후에 37 °C 항온수조에 서 1시간 반응하였다. 그 후 절단된 혼합물을 2% 아가로스 젤에서 전기영동하여 27 주 표준균종을 감별할 수 있는지를 분석하였다.

<74> 결핵균과 비결핵항산성균의 감별

<75> 미코박테리움 속 균종 중에서 임상적으로 병원성이 강한 절대병원성균인 결핵균군에 속하는 4 균종 (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*)는 391, 150 및 103bp의 독특한 3 개의 절단산물을 생산함으로써 기회감염균으로 분류되는 비결핵항산성균과 감별되었으며, 그 결과를 도 3 및 도 5에 나타나 있다.

<76> 도 3은 표준균종 644bp의 PCR 산물을  $Xho$  I으로 절단하여 2% 아가로스 젤에서 전기 영동한 사진을 나타낸 것으로 구체적으로는 다음과 같다.

<77> 레인 M: 174을  $Hae$  III 제한효소로 절단한 DNA 크기마커,

<78> 1: *M. tuberculosis*, 2: *M. bovis*,

<79> 3: *M. bovis* BCG, 4: *M. africanum*,

<80> 5: *M. avium*, 6: *M. intracellulare*,

<81> 7: *M. celatum* Type I, 8: *M. ulcerans*,

<82> 9: *M. gordonaee*, 10: *M. asiaticum*,

<83> 11. *M. marinum*, 12. *M. kansasii*,

<84> 13. *M. fortuitum* 6841, 14: *M. abscessus*,

<85> 15: *M. chelonae*, 16: *M. peregrinum*

<86> 레인 1-4까지의 결핵균군 그룹 (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*)은 다른 비결핵항산성균과 다른 절단산물을 생산함으로써 구별됨을 알 수 있었다.

<87> 신속발육균의 감별

<88> 도 3의 레인 12-16에서 신속발육균 (*M. fortuitum* 6841, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. peregrinum*)은 Xba-I 제한효소로 절단되지 않은 644bp의 산물을 생산함으로서 다른 미코박테리움 속 균종과 감별됨을 확인할 수 있다(도3 및 도5).

<89> 완속발육균과 *M. avium* complex와 *M. kansasii*의 감별

<90> 도 3에 나타난 바와 같이, 완속발육 비결핵항산성균 중에서 *M. avium* complex와 *M. kansasii*가 가장 높은 빈도로 임상검체에서 분리된다고 보고되고 있다. 본 PRA 방법은 도 3에서 보여지는 것처럼 이를 완속발육균 중에서 *M. avium* 복합체에 속하는 두 균종 *M. avium* (레인 5)과 *M. intracellulare* (레인 6)은 391, 169, 및 84bp의 절단산물을 생산함으로써 두 개의 유전자 산물 (391, 253bp)을 생산하는 *M. kansasii* (레인 11)등의 그룹과 감별이 가능하였다. 따라서, 본 발명의 PRA방법은 임상분리 균주를 대상으로 하였을 때 100% 민감도와 특이도로 동정할 수 있었다.

<91> 실시예 5: 미코박테리움속 임상분리 균종의 감별

<92> 상기 표 2에 나타난 임상분리 균종 198주에 대해 실시예 2에 따라 hsp65를 증폭하여 664bp 분절을 얻은 후에, 실시예 3의 방법에 따라 RFLP를 실시하였다.

<93> 도 4는 임상분리균종의 PCR 증폭산물을 *Xba* I으로 절단한 후 2% 아가로스 젤에 전기영동한 사진으로서 구체적으로 패널 A에서 레인 1은 174 bp을 *Hae* III 제한효소로 절단한 DNA 크기 마커이고, 레인 1-8은 *Tbc* - *M. tuberculosis* 임상분리 균종의 분석결과이고, 레인 9-16은 *Mac* - *M. avium* 복합체의 임상분리 균종의 분석결과이다. 또한 패널 B에서 레인 1-8은 *Kac* - *M. kansasii*의 임상분리 균종의 분석결과이고, 레인 9-16는 *Foc* - *M. fortuitum*의 임상분리 균종의 분석결과를 나타낸다.

<94> 도 4를 보면, 결핵균군에 속하는 54 주는 391bp, 150bp 및 103bp의 독특한 3 개의 절단산물을 생산함으로써 144주의 비결핵항산성균과 감별되었다. 또한 32주의 신속발육균은 절단되지 않고 644-bp의 산물을 생산함으로서 절단되는 나머지 168주와 구별할 수 있었다. 또한 49주의 *M. avium* 복합체의 임상분리균종은 391bp, 169bp, 84bp의 절단산물을 생산함으로써 두 개의 유전자 산물 (391, 253-bp)을 생산하는 39 주의 *M. kansasii* 등의 그룹과 감별이 가능하였다.

<95> 이처럼 본 발명에서 개발한 *hsp65* 유전자를 이용한 PRA방법은 임상분리 균종의 미코박테리아 감별에 사용할 수 있음을 확인하였다.

<96> 이상과 같은 결과들을 토대로 인체에 질환을 일으키는 중요한 미코박테리움 속 균종, 즉 결핵균군 (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*)과 비결핵항산성균 질환증에서 가장 흔한 *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*등을 포함하는 27주의 미코박테리아를 본 발명에 따른 PRA방법으로 구분할 수 있는 균종 감별법을 요약하여 도 5에 나타내었다.

## 【발명의 효과】

<97> 본 발명은 미코박테리움(*Mycobacterium*)속 균종의 유전자를 증폭하기 위한 프라이머, 이를 이용한 미코박테리움속 균종의 탐지 및 진단시약을 제공하여, 표적 유전자로서 모든 세균에 존재하는 시계분자 (chronometer molecule)인 hsp65 유전자를 이용하여 결핵균뿐만 아니라 비결핵항산성균을 동시에 증폭시켜 탐지할 수 있는 PCR 프라이머를 제공하고, 증폭된 hsp65 유전자 분절을 제한효소인 *Xho* I으로 절단하면 결핵균과 비결핵항산성균을 서로 감별할 수 있을 뿐만 아니라 비결핵항산성균도 서로 다른 절편을 형성함으로써 서로 다른 세 그룹으로 구분할 수 있으므로, 본 발명의 프라이머쌍 및 이를 이용한 PRA 방법은 기존의 어떤 방법보다도 간편하고 저렴하고 특이적인 미코박테리움 속 균종 탐지 및 동정 방법이다.

**【특허청구범위】****【청구항 1】**

SEQ ID NO: 1 및 SEQ ID NO: 2에 나타난 염기서열을 가지며, 미코박테리움(Mycobacterium)속 균종의 hsp65(Heat Shock Protein 65) 유전자 분절을 특이적으로 증폭시키는 프라이머쌍.

**【청구항 2】**

제 1항의 프라이머쌍을 이용하여 미코박테리움속 균종의 hsp65 유전자 분절을 증폭하고, 상기 증폭된 분절내에 존재하는 특정 제한효소 인식부위를 이용한 RFLP 분석(Restriction Fragment Length Polymorphism)으로 미코박테리움속 균종을 동정하는 방법

**【청구항 3】**

제 2 항에 있어서, 상기 제한효소는 Xho I인 방법.

**【청구항 4】**

제 3 항에 있어서, 상기 증폭된 hsp65 분절을 제한효소 Xho I로 처리한 후 RFLP 분석에 의해 결핵균과 비결핵항산성균을 구별하여 동정하는 방법.

**【청구항 5】**

제 4 항에 있어서, 상기 결핵균은 제한효소로 절단된 hsp65 분절의 단편크기가 391bp, 150bp, 및 103 bp인 방법.

**【청구항 6】**

제 3 항에 있어서, 상기 증폭된 hsp65 분절이 *Xho* I으로 절단되지 않은 644bp 단편인 것은 신속발육균인 것을 특징으로 하는 비결핵항산성균중 신속발육균을 구별하여 동정하는 방법.

**【청구항 7】**

제 3 항에 있어서, 상기 증폭된 hsp65 분절을 *Xho* I로 처리한 후 RFLP분석에 의해 얻어진 단편의 크기가 391bp, 169bp, 및 84bp를 갖는 것을 특징으로 하는, 미코박테리움 아비움(*M. avium*), 미코박테리움 인트라셀룰라레(*M. intracellularare*), 미코박테리움 셀라툼(*M. celatum*), 미코박테리움 쇠모이데(*M. shimoidei*), 및 미코박테리움 줄가이(*M. szulgai*)로 이루어진 군에서 선택된 미코박테리움속 균군을 동정하는 방법.

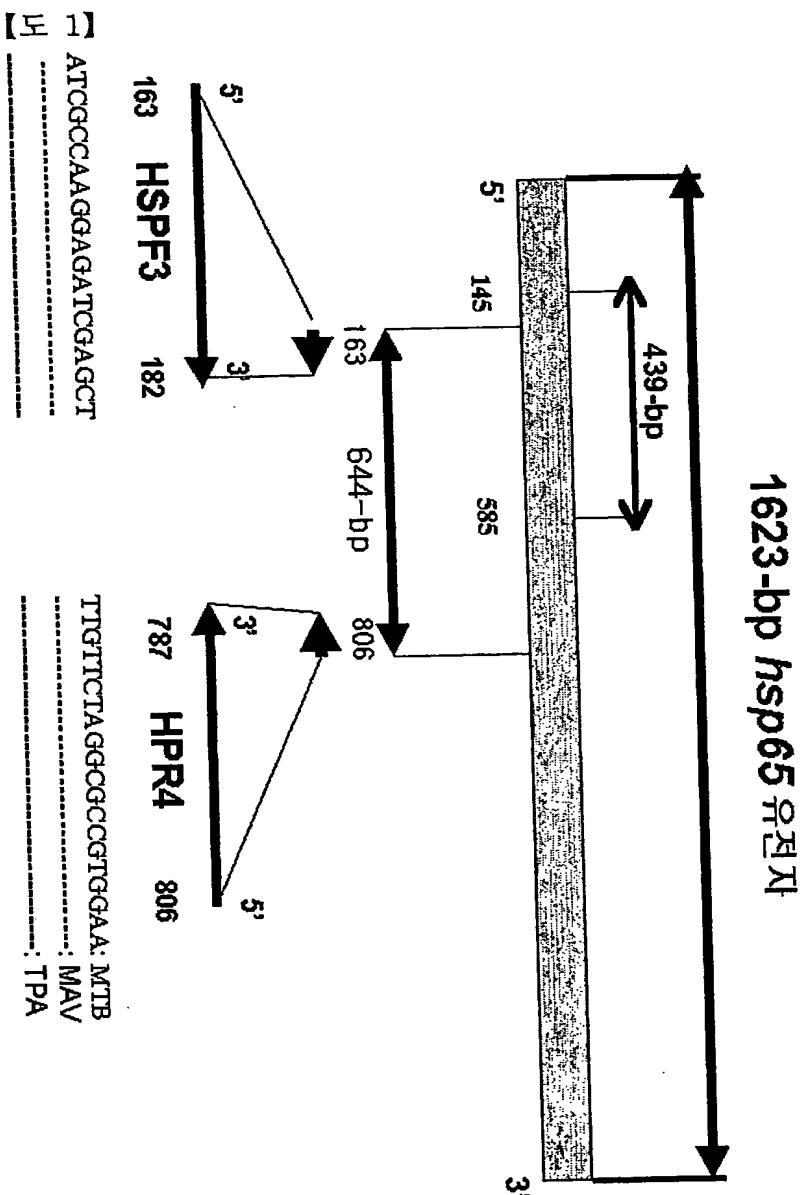
**【청구항 8】**

제 3 항에 있어서, 상기 증폭된 hsp65 분절을 *Xho* I로 처리한 후 RFLP분석에 의해 얻어진 단편의 크기가 391bp, 및 253bp를 갖는 것을 특징으로 하는, 미코박테리움 가스트리(*M. gastri*), 미코박테리움 제나벤세(*M. genavense*), 미코박테리움 고르도네(*M. gordonaiae*), 미코박테리움 해모필럼(*M. haemophilum*), 미코박테리움 칸사시(*M. kansasii*), 미코박테리움 말모엔세(*M. malmoense*), 미코박테리움 마리눔(*M. marinum*), 미코박테리움 스크로풀라세움(*M. scrofulaceum*), 미코박테리움 시미애(*M. simiae*), 및 미코박테리움 울세란스(*M. ulcerans*)로 이루어진 군에서 선택된 미코박테리움속 균군을 동정하는 방법.

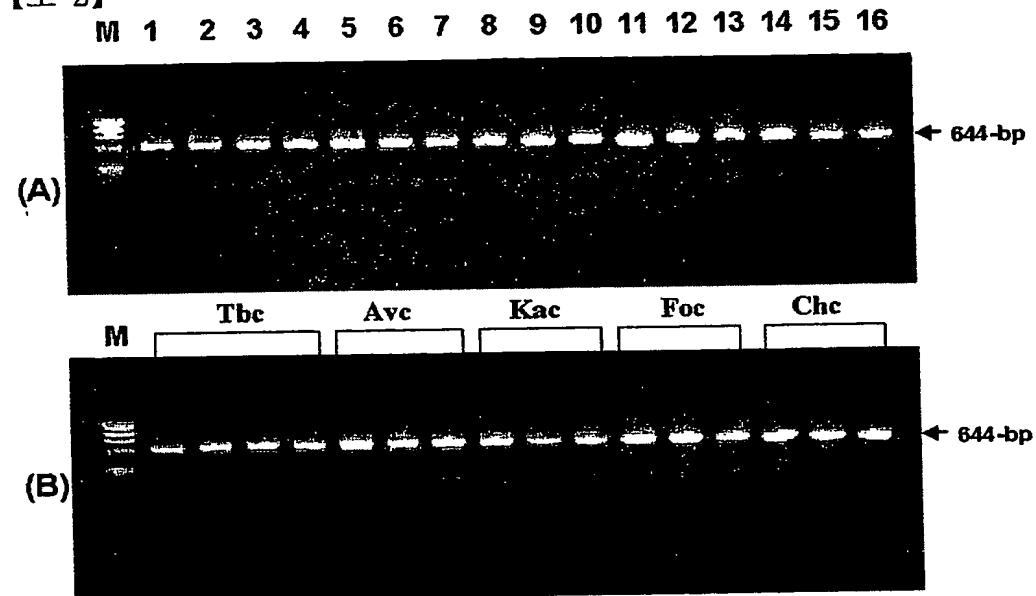
## 【청구항 9】

제 1항의 프라이머쌍 및 *Xba* I 제한효소를 포함하며, 상기 프라이머쌍을 이용하여 시료에 포함된 미코박테리움속 균종의 *hsp65* 유전자 분절을 얻고 RFLP를 수행하여 얻어진 분절의 크기로서 결핵균과 비결핵 항산성균을 감별 및 진단하기 위한 진단키트.

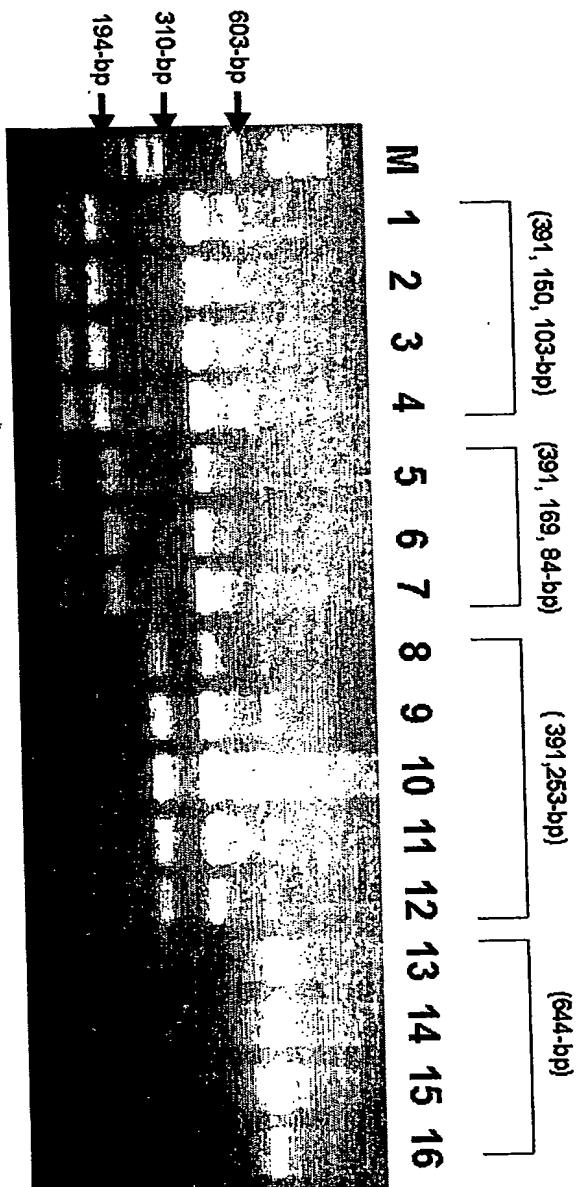
## 【도면】

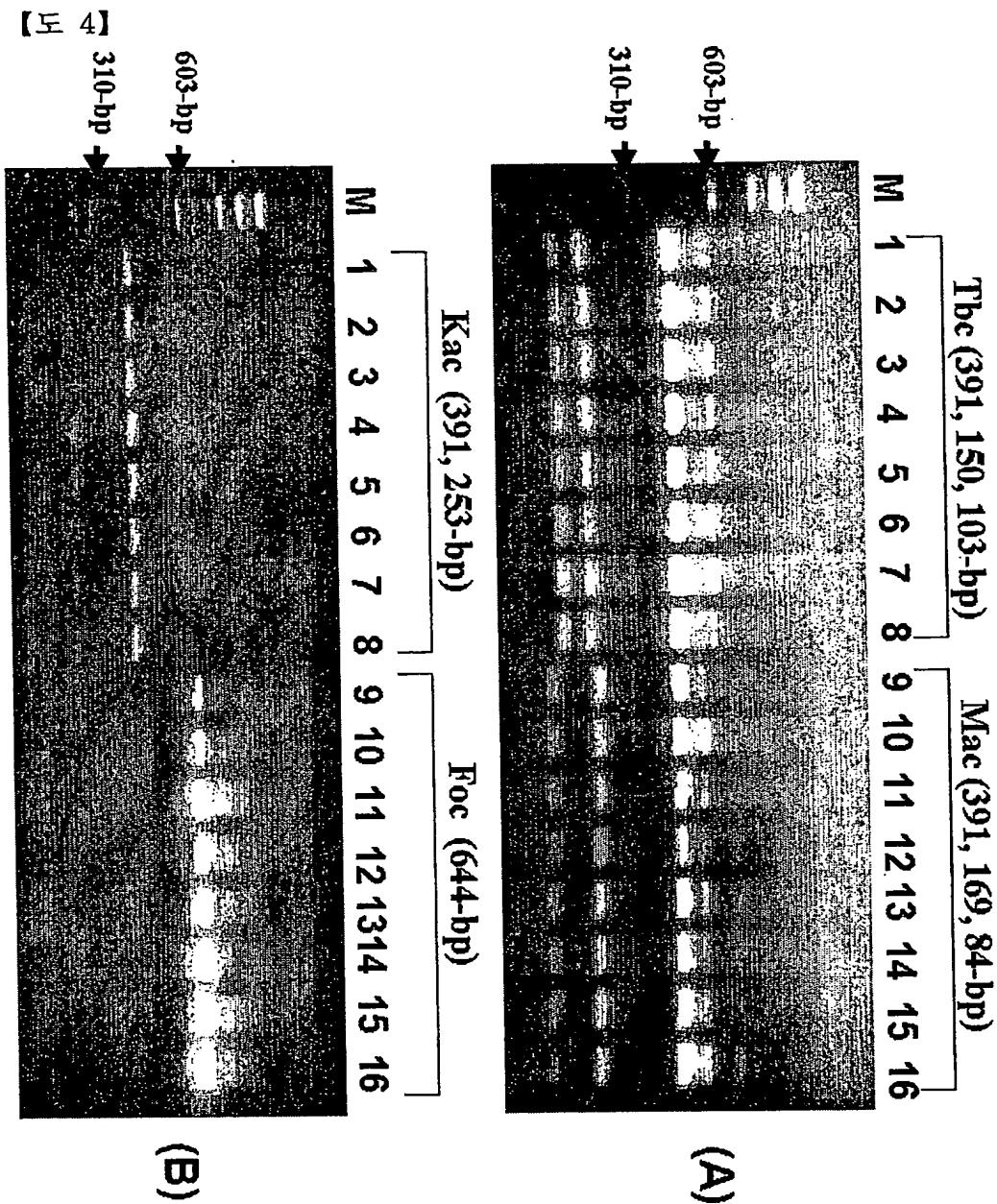


【도 2】

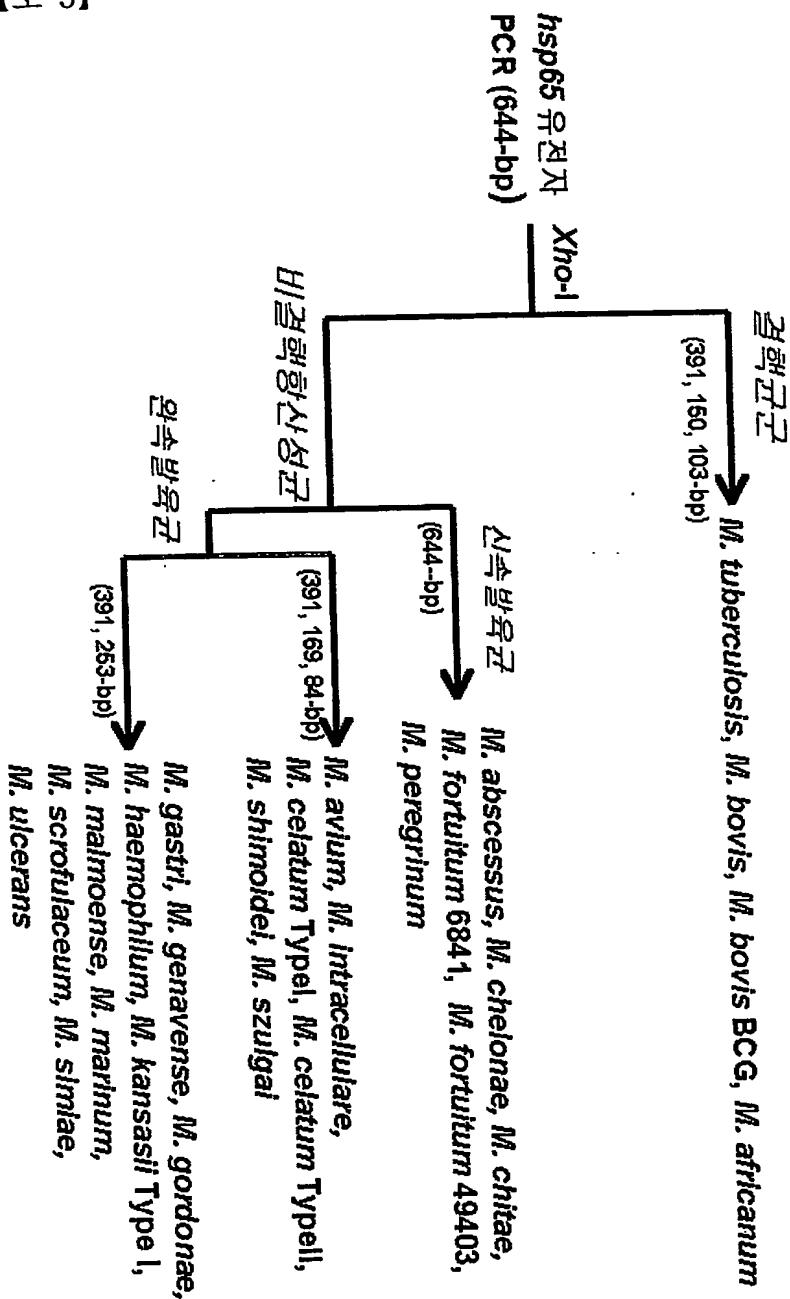


【도 3】





【도 5】



## 【서열목록】

<110> KIM, BumJoon <120> PRIMERS FOR AMPLIFYING HSP 65 GENE OF MYCOBACTERIAL  
SPECIES AND IDENTIFICATION METHOD OF MYCOBACTERIAL SPECIES WITH THE SAME

<130> DPP20020021 <160> 2 <170> Kopatent In 1.71 <210> 1 <211> 20 <  
<212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Forward Primer <400> 1  
atcgccaagg agatcgagct 20 <210>  
2 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Backward  
- primer <400> 2 aaggtgccgc ggatcttgtt  
20

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**